

正交试验优选江边一碗水的醋炙工艺

邓旭坤*, 蒋捷, 林亲雄, 陈旅翼, 蔡爽, 吴非, 高康丽, 张地, 张锦
(中南民族大学药学院, 武汉 430074)

[摘要] 目的: 优选江边一碗水的醋炙工艺。方法: 以鬼臼毒素含量为指标, 通过正交试验考察闷润时间、醋用量、炒制时间、炒制温度对醋炙工艺的影响。采用 HPLC 测定鬼臼毒素含量, 流动相甲醇-0.1 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾水溶液 (45:55), 检测波长 290 nm。结果: 最佳炮制工艺为醋用量 30%, 闷润时间 2 h, 炒制温度 150 °C, 炒制时间 4 min; 醋用量、炒制时间对醋炙工艺的影响具有显著性意义, 鬼臼毒素质量分数达 5.48%。结论: 该炮制工艺合理可行, 可为江边一碗水的民间安全用药提供参考。

[关键词] 醋炙法; 江边一碗水; 鬼臼毒素; 正交试验; 炮制工艺

[中图分类号] R283.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)10-0023-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014100023

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000078.html>

[网络出版时间] 2014-03-07 10:47

Optimization of Processing Technology of *Diphylleia sinensis* Stir-baked with Vinegar by Orthogonal Test

DENG Xu-kun*, JIANG Jie, LIN Qin-xiong, CHEN Lv-yi, CAI Shuang,
WU Fei, GAO Kang-li, ZHANG Di, ZHANG Jin

(School of Pharmacy, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize processing technology of *Diphylleia sinensis* stir-baked with vinegar. **Method:** Taking the content of podophyllotoxin as index, orthogonal test was adopted to optimize processing technology with four factors including moistening time, the amount of vinegar, frying time and temperature. With mobile phase of methanol-0.1 mol·L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate solution (45:55) and detection wavelength at 290 nm, the content of podophyllotoxin was determined by HPLC. **Result:** The best processing technology was as following: moistened 2 h with 30% vinegar, flew 4 min at 150 °C. The amount of vinegar and frying time had significantly effects on processing technology, the mass fraction of podophyllotoxin was up to 5.48%. **Conclusion:** This optimized processing technology was reasonable and feasible. This result could provide a reference for medication safety of *D. sinensis* in folk.

[Key words] stir-baked with vinegar; *Diphylleia sinensis*; podophyllotoxin; orthogonal design; processing technology

江边一碗水是武陵山区土家族常用的民族药

[收稿日期] 20140114(006)

[基金项目] 国家科技部“十二五”科技支撑计划项目 (2012BAI27B06); 国家自然科学基金项目 (81073147)

[通讯作者] * 邓旭坤, 博士, 副教授, 从事民族药学、药理毒理学和中药炮制学研究, Tel: 13407100639, E-mail: 842563832@qq.com

材, 主要分布于湖北、甘肃、陕西、云南、四川等省区^[1], 具有祛风除湿、破瘀散结、止痛、解毒等功效, 常用于治疗风湿腰腿疼痛、跌打损伤、痈肿疮疖、毒蛇咬伤等疾病^[2]。鬼臼毒素为江边一碗水的主要活性成分之一, 该成分及其衍生物依托泊苷和替尼泊苷具有明显的抗病毒、抗肿瘤活性^[3-4], 可用于治疗 HPV 引起的尖锐湿疣等疾病^[5-6]。

增效减毒为中药炮制的主要目的之一, 探讨炮

制前后化学成分的含量变化、药效或毒性作用的变化是中药炮制机制研究的主流思路^[7]。通过查阅文献及实地调研发现^[8],江边一碗水具有较强的毒性^[9],土家医在临床使用前通常会对该药材进行处理,主要炮制方法包括童便制、醋蒸、醋炙^[10]等。前期研究考察了这3种传统炮制方法对药材化学成分的影响,结果发现鬼臼毒素的含量均存在不同程度的提高,其中以醋炙品中鬼臼毒素含量升高最为显著。故本实验采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优选江边一碗水的醋炙工艺,为该药材的安全用药提供参考。

1 材料

Ultimate 3000 型高效液相色谱仪(美国戴安),101-OAB 型电热鼓风干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司),ASWO-0005-M 型超纯水机(重庆颐洋企业发展有限公司),CP 214 型电子天平(奥豪斯仪器上海有限公司),C16-22E 型电磁炉(广东康宝电器有限公司)。

江边一碗水药材购于亳州市飒枫药业有限公司,经中南民族大学万定荣教授鉴定为南方山荷叶 *Diphylleia sinensis* H. L. Li 的根茎;鬼臼毒素对照品(批号 23301,中国食品药品检定研究院),米醋(镇江恒顺醋业股份有限公司,总酸含量以醋酸计 $\geq 9.0\%$),甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

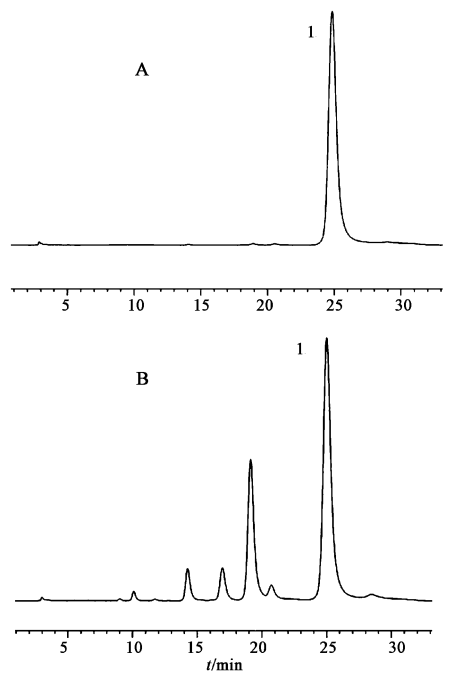
2.1 鬼臼毒素的含量测定

2.1.1 色谱条件^[11] Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μ m),流动相甲醇-0.1 mol \cdot L⁻¹磷酸二氢钾水溶液(45:55),柱温 30 $^{\circ}$ C,流速 1 mL \cdot min⁻¹,检测波长 290 nm,进样量 10 μ L,见图 1。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取于五氧化二磷干燥器中减压干燥 12 h 的鬼臼毒素对照品适量,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成约 1.0 g \cdot L⁻¹的溶液,作为储备液。精密吸取储备液 10 mL,加甲醇制成约 0.2 g \cdot L⁻¹的溶液,摇匀,即得^[12]。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取生品或炮制品粉末(过 3 号筛)各 0.2 g,加入三氯甲烷 50 mL,置水浴中加热回流 1 h,放冷,滤过,滤液挥干三氯甲烷后加甲醇溶解,过滤,滤液定容于 50 mL 量瓶中,即得^[11]。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取对照品储备液 0.5,1,2,3,5 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,按 2.1.1 项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 78.816X + 0.0911$ ($r = 0.9994$),线性范围 0.5 ~ 5 μ g。



A. 对照品;B. 生品;1. 鬼臼毒素
图 1 江边一碗水提取液 HPLC

2.1.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μ L,重复进样 5 次,按 2.1.1 项下色谱条件测定,结果峰面积的 RSD 1.09%,表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 精密量取同一供试品溶液,分别于制备后 0,3,6,9,12 h 按 2.1.1 项下色谱条件测定,结果鬼臼毒素峰面积的 RSD 1.89%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.1.7 重复性试验 称取同一药材粉末 0.2 g,共 6 份,按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,结果峰面积的 RSD 1.56%,表明该方法重复性良好。

2.1.8 加样回收试验 精密称取已知含量的江边一碗水粉末 6 份,每份约 0.1 g,各加入鬼臼毒素对照品 3.820 mg,按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算回收率,结果鬼臼毒素的平均加样回收率 98.3% (RSD 1.71%),表明该方法准确可靠,见表 1。

2.2 醋炙工艺优选 根据江边一碗水的性质,选取闷润时间、辅料用量、炒制时间、炒制温度为考察因素,以鬼臼毒素质量分数为指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优选醋炙工艺,因素水平见表 2。称取净江边一碗水 25 g,共 9 份,加入一定量米醋,分别置适宜的容器内闷润相应时间,按不同温度与时间分别炒制,取出干燥,备用,试验安排及结果见表 3,方差分析见表 4。

表1 江边一碗水中鬼臼毒素含量测定的加样回收率考察

No.	称样量 /g	样品中含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%
1	0.102 0	3.876	7.481	97.2
2	0.100 9	3.834	7.417	96.9
3	0.103 9	3.948	7.651	98.5
4	0.102 3	3.887	7.514	97.5
5	0.101 5	3.857	7.792	101.5
6	0.104 2	3.960	7.632	98.1

表2 江边一碗水醋炙工艺正交试验因素水平

水平	A 闷润时间 /h	B 醋用量 /%	C 炒制时间 /min	D 炒制温度 /℃
1	1	10	4	110
2	2	20	5	150
3	3	30	6	190

表3 江边一碗水醋炙工艺正交试验安排及直观分析

No.	A	B	C	D	鬼臼毒素/%
1	1	1	1	1	5.17
2	1	2	2	2	4.16
3	1	3	3	3	4.11
4	2	1	2	3	3.79
5	2	2	3	1	3.65
6	2	3	1	2	5.48
7	3	1	3	2	4.36
8	3	2	1	3	4.12
9	3	3	2	1	4.93
K_1	4.480	4.440	4.932	4.583	
K_2	4.307	3.977	4.293	4.667	
K_3	4.470	4.840	4.040	4.007	
R	0.173	0.863	0.883	0.660	

表4 醋炙工艺方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A(误差)	0.057	2	1.000	
B	1.120	2	19.649	<0.05
C	1.241	2	21.772	<0.05
D	0.775	2	13.596	>0.05

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

由直观分析可知,各因素对醋炙工艺的影响顺序为 $C > B > D > A$ 。以极差最小的 A 因素为误差项进行方差分析,结果显示 B, C 因素对醋炙工艺的影响具有显著性差异, D 因素则无显著性差异,确定江边

一碗水最佳炮制工艺为 $A_2B_3C_1D_2$,即醋用量 30%,闷润时间 2 h,炒制时间 4 min,炒制温度控制在 150 ℃。

3 讨论

传统理论认为当醋与药物相须配伍炮制时,可引药入肝经,增强散瘀止痛、疏肝行气的功效^[9],此外醋炙法还可促进药材中有效成分的煎出。通过正交试验证实了醋炙法可显著提取江边一碗水炮制品中鬼臼毒素的提取率。

鬼臼毒素的含量测定时,选择甲醇-0.1 mol·L⁻¹磷酸二氢钾水溶液作为流动相,发现容易造成色谱柱堵塞,柱压过高,但用水溶液代替磷酸二氢钾会导致色谱峰分离效果不佳。通过多次进样采集后,显示先用水-甲醇溶液(9:1)洗脱 5 min,再加甲醇-0.1 mol·L⁻¹磷酸二氢钾水溶液(45:55)平衡一段时间,即可保证较佳的分离效果。

[参考文献]

[1] 韩腾飞,董浩,程亮,等.江边一碗水的药用研究概况[J].中成药,2012,34(6):1151.

[2] 陈吉炎,于萍,陈师西,等.江边一碗水的本草考证[J].中药材,2010,33(2):303.

[3] Canel C, Moraes R M, Frank E D, et al. Podophyllotoxin [J]. Phytochem, 2000, 54(2):115.

[4] 陆炜强,傅承新,赵云鹏.鬼臼毒素生物合成研究进展[J].中国中药杂志,2011,36(9):1109.

[5] Gordaliza M, García P A, Castro M A, et al. Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives [J]. Toxicon, 2004, 44(4):441.

[6] 黄雄,林敏超,余柏村,等.鬼臼毒素及其衍生物新型制剂抗肿瘤作用研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(13):296.

[7] 高飞,傅超美,胡慧玲,等.关于中药炮制机制研究现状与发展趋势的思考[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(5):352.

[8] 田华咏.中国民族药炮制集成[M].北京:中医古籍出版社,2000:9,214.

[9] 徐祥,酆小平.八角莲的毒理学研究现状[J].亚太传统医药,2011,7(8):158.

[10] 王静,毛春芹,陆慧林.中药醋制法研究进展[J].中国中医药信息杂志,2009,16(1):99.

[11] 赵祖兴.江边一碗水的质量控制研究[D].武汉:湖北中医药大学,2010.

[12] 湖北省食品药品监督管理局.湖北省中药材质量标准[M].武汉:湖北科学技术出版社,2007:57.

[责任编辑 刘德文]